

食道扁平上皮癌の発癌過程における DNA メチル化の役割

石井 龍宏^{a*}, 村上 純^b, 能登原憲司^c, 笹本博美^a, 神原 健^a, 白川靖博^a,
猶本良夫^a, 大内田 守^d, 清水憲二^d, Jeremy R. Jass^e, 松原長秀^a, 田中紀章^a

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ^a消化器・腫瘍外科学, ^b歯科口腔放射線学, ^c病態探究医学,
^d分子遺伝学, ^eDepartment of pathology, McGill University, Montreal, Canada

キーワード：食道扁平上皮癌, プロモーターメチル化, p53 遺伝子変異

はじめに

食道扁平上皮癌は治療法の進歩にもかかわらず現在も非常に予後不良の癌腫である。早期診断早期治療が重要であるがその診断法は未だに確立されておらず、多くは進行癌にて発見されるのが現状である。前癌状態にある高リスク群をスクリーニングする診断法が確立できれば、飲酒喫煙などのリスクファクター^{1,2)}を減らす等食道癌予防対策を施した上、フォローアップによる早期発見につながると思われる。

食道扁平上皮癌の発癌過程では食道上皮の異形成病変と p53 遺伝子変異の集積に関連することが明らかになっているが^{3,4)}、癌化過程 (dysplasia-carcinoma シーケンス) の分子機構は未だ不明である。一方、近年遺伝子の構造変化が無くてもその修飾により発現が調節される機構 (プロモーターメチル化) が注目されており、食道扁平上皮癌にも関与していることが報告されてきたが、正常粘膜、異形成病変内での変化は未だ

明らかにされていない。

本研究では、14種の癌関連遺伝子の DNA プロモーターメチル化と、p53 遺伝子変異に着目し、56例の食道癌症例の正常粘膜、異形成病変、癌病変と、対照として42例の健常人食道粘膜 (42例) における各段階の変化を詳細に解析した。

この結果、食道癌背景粘膜においてメチル化異常が健常人一癌背景正常粘膜一異形成病変一癌病変、と段階的に増加していき、メチル化異常が高度に蓄積する異形成病変では p53 変異が出現、これを一因として癌化に至る過程、すなわち dysplasia-carcinoma シーケンスの分子機構をはじめて明らかにした。

DNA メチル化とは

DNA 発現に変化をもたらす機構として有名なのは DNA 突然変異であるが、これは塩基配列の変化によるもので不可逆の反応である。これに対し近年注目されているのがメチル化という反応である。DNA の各部の発現を司るプロモーター領域にメチル基が付いてメチル化がおくとプロモーター領域内の発現が抑制され、メチル基がはずれると発現するという可逆性の反応である。核内の DNA には全ての遺伝子情報が含まれているにもかかわらず各組織の各細胞は特定の分

平成19年5月受理

*Queensland Institute of Medical Research BH07, Royal Brisbane Hospital, 300 Herston Road, Brisbane QLD 4029
電話：61-7-3362-0222 FAX：61-7-3362-0111
E-mail：Tatsuhiko.Ishii@qimr.edu.au

プロフィール



石井 龍宏

平成9年高知医科大学卒業、岡山大学第一外科（現消化器腫瘍外科）入局。平成15年より同外科田中紀章教授、松原長秀講師の下で DNA メチル化を主とした癌遺伝子診断に関する研究を開始。p53解析に関しては分子遺伝学教室の清水憲二教授、大内田守助教授との共同研究を行った。平成18年6月、研究成果をイギリス消化器病学会誌 GUT に発表。平成19年5月よりオーストラリア Royal Brisbane Hospital, Queensland Institute of Medical Research にてメチル化の権威である Dr. Barbara Leggett のもと癌遺伝子診断に関する研究を開始した。常に臨床の立場からの研究を心にかけている。

化を示す。遺伝子内のほとんどの情報はメチル化で抑制されており、必要に応じて発現する、つまりメチル化は DNA の発現調節機構と言える。

近年、多種の癌関連遺伝子が発見されているが、腫瘍内ではこれらにメチル化異常をきたしているものが多く発見されている⁸⁻¹⁰⁾。例えば癌を抑制する働きをしている癌抑制遺伝子にメチル化がおこると、働きが不活化され発癌を促す一因となってしまう。

食道扁平上皮癌の発癌説

現在、食道扁平上皮癌の発癌説として dysplasia - carcinoma sequence が提唱されており、これは病理学的に食道上皮の異形成病変（Intra Epithelial Neoplasia：IEN）を母体として癌が発生する形態が多いためである。

また、食道扁平上皮癌は他の消化器癌と比較して多発癌が多い。これは背景粘膜に異形成病変が広範囲に多発する形態が多くみられ、粘膜全体の広範囲に悪性度が高まることから field cacinogenesis として説明されている⁵⁻⁷⁾。異形成病変はルゴール不染帯とほぼ一致し、広範囲に不染帯が散在する、いわゆる「まだら食道」と臨床的にいわれるものがこれにあたる。しかしこれら 2 説の分子学的な変化は未だ明らかにされていない。

ない。

これまでの研究で食道扁平上皮癌に *p 53* 遺伝子変異が高率に存在すること、癌関連遺伝子のメチル化が高率に存在することが示されているが、正常粘膜から異形成病変での変化は明らかにされていない。

正常粘膜から異形成病変を経て癌種にいたる各段階の分子学的変化を明らかにすることを本研究の目的とした。

対 象

食道扁平上皮癌切除症例 56 例に対し、癌背景粘膜の正常部（background normal：56 例）、異形成病変部（IEN：21 例）、癌部（ESCC：56 例）。またコントロールとして健常人の食道正常粘膜（normal control：42 例）を用いた。ESCC 患者の平均年齢は 65.8 歳で男女比は 47：9、健常人では 67.7 歳で 25：17 であった。ESCC では同時性多発癌が比較的多く、これは異形成病変（ルゴール不染帯）の多発するものに高頻度で、飲酒喫煙者の割合も高かった（表 1）。

また、PAS 染色ではグリコーゲン陽性細胞が染まるため、ルゴール染色とほぼ一致する（図 1）。中段の異形成病変部（左側）ではグリコーゲン陽性細胞が消失しており、ルゴール不染部に一致している。ルゴール

表 1 臨床病理学的所見

| | | ESCC (n = 56) | Intraepithelial Neoplasia (n = 21) | Background Normal (n = 56) | Normal Control (n = 42) | p-value |
|-----------------|------------|------------------|---------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|---------|
| Age | mean age | 65.8 | 64 | 65.8 | 67.9 | 0.6 |
| | median age | 67 | 67 | 67 | 71 | |
| Gender | male | 47 | 18 | 47 | 25 | 0.006 |
| | female | 9 | 3 | 9 | 17 | |
| Lesion | single | 36 | 7 | 36 | | |
| | multiple | 20 | 14 | 20 | | |
| Stage | 1 | 4 | 1 | 4 | | |
| | 2 | 16 | 7 | 16 | | |
| | 3 | 23 | 6 | 23 | | |
| | 4 | 13 | 7 | 13 | | |
| Differentiation | well | 9 | 5 | 9 | | |
| | mod | 30 | 10 | 30 | | |
| | poor | 17 | 6 | 17 | | |
| Smoke | smoker | 43 | 19 | 43 | | |
| | non-smoker | 13 | 2 | 13 | | |
| Alcohol | drink | 45 | 20 | 45 | | |
| | non-drink | 11 | 1 | 11 | | |

ESCC では同時性多発癌が比較的多く、これは異形成病変（Intraepithelial Neoplasia）の多発するものに高頻度で、飲酒喫煙者の割合も高かった。

不染帯多発食道ではこのような構造が多発しており，ここから carcinoma in situ, carcinoma へと悪性度を高めていくと思われる。

癌関連遺伝子のメチル化

14種類の癌関連遺伝子のプロモーター領域のメチル化について MSP, COBRA 法¹⁰⁻¹⁵⁾を用いて検索したところ，*COX2*, *hMLH1* をのぞくほとんどのマーカーで各段階でのメチル化数の増加を認めている（表2）。メチル化総数の平均で比較しても健常人より癌背景粘膜の正常部でメチル化数は増加しており，正常粘膜とはいえ潜在的悪性度は高まっている。異形成病変では癌部と同程度のメチル化の蓄積を示していた（図2）。各段階でメチル化をおこしているマーカー数は増加しているが，個々のマーカーに癌特異的マーカーはなかった。

p53 遺伝子変異との関係

p53 遺伝子のエクソン 5－9 の遺伝子配列に対しシーケンスを行った¹⁶⁾。この結果56例の ESCC で35例（62.5%，38部位）の突然変異が存在し，異形成病変

表2 各段階におけるプロモーターメチル化の頻度

| gene/loci | Number of patients with methylation in designated loci (%) | | | |
|----------------------------|--|---|------------------------------------|---------------|
| | Normal control epithelium (n = 42) | Background non-neoplastic epithelium (n = 56) | Intraepithelial neoplasia (n = 21) | ESCC (n = 56) |
| <i>MGMT</i> | 10(23.8) | 42(75.0) | 17(81.0) | 45(80.4) |
| <i>SFRP1</i> | 9(21.4) | 25(44.6) | 13(61.9) | 36(64.3) |
| <i>p16^{INK4a}</i> | 0(0) | 18(32.1) | 8(38.1) | 22(39.3) |
| <i>DCC</i> | 0(0) | 3(5.4) | 8(38.1) | 26(46.4) |
| <i>MINT1</i> | 0(0) | 1(1.8) | 3(14.3) | 14(25.0) |
| <i>MINT2</i> | 4(9.5) | 2(3.6) | 1(4.8) | 8(14.3) |
| <i>MINT31</i> | 1(2.4) | 4(7.1) | 7(33.3) | 18(32.1) |
| <i>CACNA1G</i> | 0(0) | 6(10.7) | 5(23.8) | 13(23.2) |
| <i>DAPK</i> | 2(4.8) | 3(5.4) | 5(23.8) | 15(26.8) |
| <i>p14^{ARF}</i> | 0(0) | 2(3.6) | 2(9.5) | 7(12.5) |
| <i>SFRP2</i> | 2(4.8) | 5(8.9) | 3(14.3) | 11(19.6) |
| <i>APC1A</i> | 4(9.5) | 10(17.9) | 4(19.0) | 15(26.7) |
| <i>COX2</i> | 0(0) | 0(0) | 0(0) | 0(0) |
| <i>hMLH1</i> | 0(0) | 1(1.8) | 0(0) | 6(10.7) |

14種類の癌関連遺伝子のプロモーター領域のメチル化を検索したところ *COX2*, *hMLH1* をのぞくほとんどのマーカーで各段階でのメチル化数の増加を認めている。ただし癌特異的マーカーはなかった。

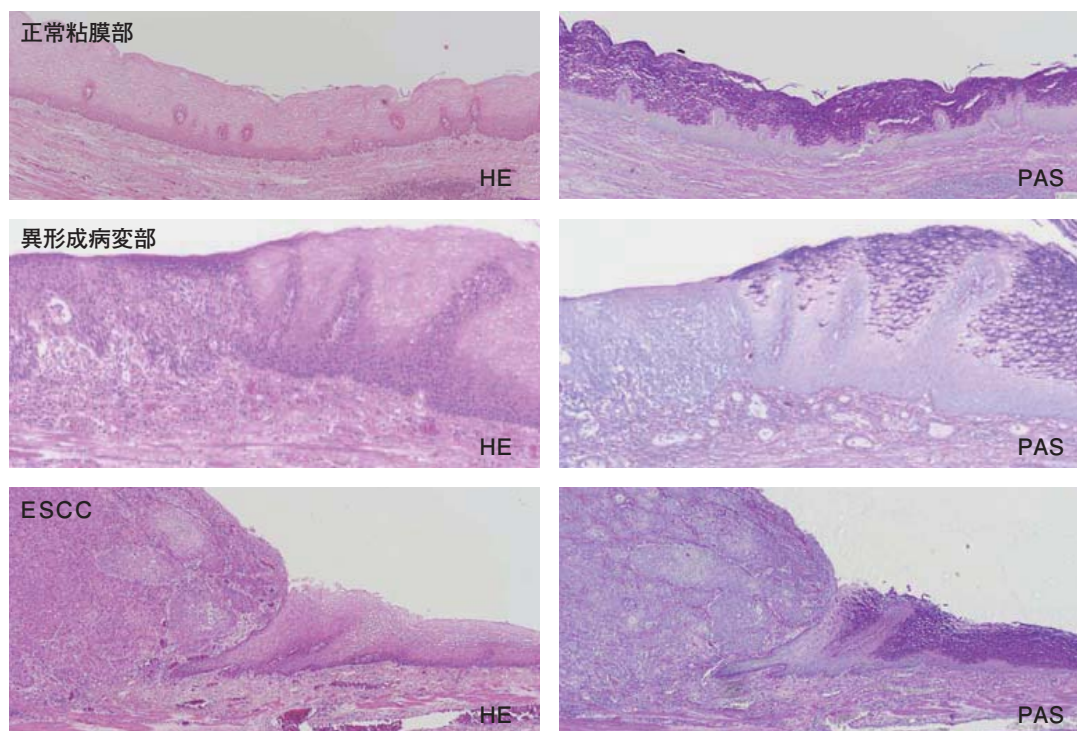


図1 組織学的特徴

PAS 染色ではグリコーゲン陽性細胞が染まるため，ルゴール染色とほぼ一致する。異形成病変部，ESCC 部ではグリコーゲン陽性細胞が消失し，ルゴール不染部を形成する。

21例でも12例（57%，14部位）と同程度（ $p=0.2$ ）に高率であった。しかし癌背景粘膜正常部，健常人にはほとんど存在せず，異形成病変での高変異率と大きく

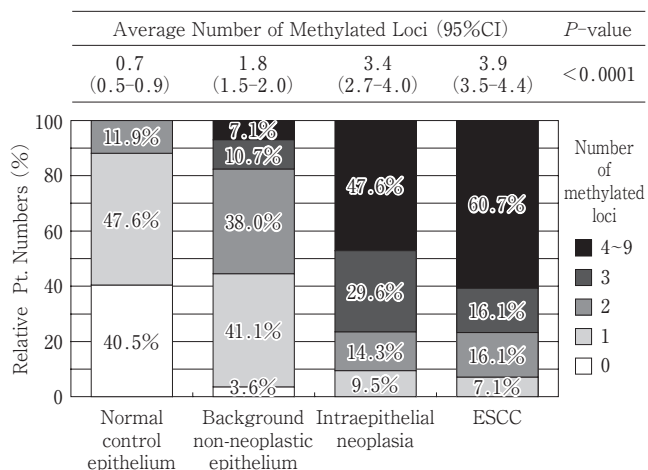


図2 各段階におけるメチル化総数の頻度と平均
健常人より癌背景粘膜の正常部でメチル化数は増加しており，正常粘膜とはいえ潜在的悪性度は高まっている。異形成病変では癌部と同程度のメチル化の蓄積を示していた。

異なっていた（ $p<0.0001$ ）（図3）。正常粘膜と比較して癌背景粘膜ではメチル化異常は徐々に増加するがこの段階では $p53$ 変異は出現しない。異形成病変の段階でメチル化異常の蓄積が高度になるとリンクして $p53$ の異常も高度に出現し，分子学的に癌と同程度に

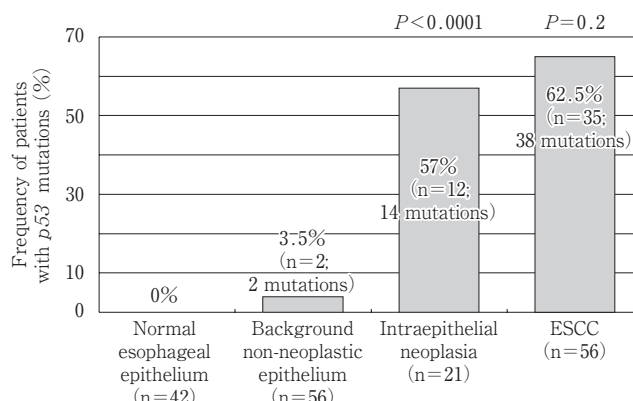


図3 各段階における $p53$ 遺伝子突然変異
異形成病変から $p53$ の異常が高度になっており，メチル化異常の蓄積が高度になるとリンクしている。異形成病変では分子学的に癌と同程度に悪性度が高まっていると思われる。

表3 同一症例内における異形成病変部と ESCC 部の $p53$ 突然変異部位とメチル化頻度

| Pt. No. | gender | age | differentiation | stage | no. of methylation | | $p53$ mutation spectrum | |
|---------|--------|-----|-----------------|-------|---------------------------|------|---------------------------|-------|
| | | | | | Intraepithelial neoplasia | ESCC | Intraepithelial neoplasia | ESCC |
| 1 | M | 51 | mod | IV | 6 | 6 | C580T | G422A |
| 2 | M | 67 | poor | III | 4 | 4 | C449T | C535T |
| 3 | M | 53 | poor | III | 7 | 7 | G437A/A659G | G818T |
| 4 | M | 62 | poor | IV | 4 | 6 | deletion | A659G |
| 5 | M | 70 | mod | IV | 2 | 4 | w | T400G |
| 6 | M | 76 | poor | III | 3 | 4 | w | C637T |
| 7 | M | 54 | well | III | 3 | 6 | w | A659G |
| 8 | F | 73 | well | II | 2 | 5 | w | G824A |
| 9 | M | 70 | well | III | 4 | 5 | w | G743A |
| 10 | F | 69 | well | II | 4 | 3 | A659G | w |
| 11 | M | 74 | mod | II | 3 | 3 | A671G | w |
| 12 | M | 61 | mod | II | 4 | 4 | A659G | w |
| 13 | M | 70 | mod | II | 5 | 5 | A659G | w |
| 14 | M | 69 | poor | I | 3 | 2 | T755C | w |
| 15 | F | 54 | mod | III | 2 | 2 | T421C/A659G | w |
| 16 | M | 68 | well | II | 3 | 2 | A659G | w |
| 17 | M | 46 | mod | IV | 6 | 5 | A659G | A659G |
| 18 | M | 63 | mod | IV | 2 | 3 | w | w |
| 19 | M | 60 | mod | II | 4 | 3 | w | w |
| 20 | M | 66 | mod | IV | 2 | 5 | w | w |
| 21 | M | 69 | well | IV | 3 | 4 | w | w |

同一症例内でも異形成病変部と癌部では $p53$ の突然変異部位がほとんどの症例で異なっていた。これは食道背景粘膜における発癌過程が独立して多発していることを示している。

悪性度が高まると思われる。これが dysplasia-carcinoma sequence での分子学的一側面と思われる。MGMT のメチル化は G : C to A : T Mutation に関与しており p 53 に影響する因子であるか¹⁷⁻¹⁹⁾，今回 p 53 との有意な関与を認めなかった。

一方，p 53 の突然変異パターンは同一症例においても異なる場所から採取した異形成病変部と癌部とではほとんどの症例で異なっていた（表 3）。これは食道癌背景粘膜における発癌過程は食道粘膜に広範囲に散在する異形成病変部でそれぞれ独立して発生していることを示しており，広範囲に悪性度が高まる field cacinogenesis の要因である。いわゆるまだら食道と呼ばれるルゴール不染帯多発食道ではこのような異形成病変が多発していることから ESCC のハイリスクグループであることがわかる。

おわりに

今回我々は食道扁平上皮癌における多種のプロモーターメチル化の蓄積と p 53 突然変異の関係より各段階の分子学的変化を明らかにし，dysplasia-carcinoma sequence と field cacinogenesis の一端を解明し得た。この発癌に至る分子機構を明らかにしたことで，p 53 遺伝子異常が発生する可能性が高い組織をメチル化異常で検出し得る可能性を示した。今回我々の 14 種のメチル化マーカーには特異的なものはなかったが，今後特異的メチル化マーカーを同定できれば，食道粘膜検査により高リスク群を判定するスクリーニング診断に実際の臨床応用が可能になると思われる。

文 献

- 1) Hiyama T, Soto T, et al. : Second primary cancer following laryngeal cancer with special reference to smoking habits. *Jpn J Cancer Res* (1992) **83**, 334-339.
- 2) Morita M, Kusano H, et al. : Multiple occurrence of carcinoma in the upper aerodigestive tract associated with esophageal cancer : reference to smoking, drinking and family history. *Int J Cancer* (1994) **58**, 207-210.
- 3) Wang LD, Hong JY, et al. : Accumulation of p53 protein in human esophageal precancerous lesions : a possible early biomarker for carcinogenesis. *Cancer Res* (1993) **53**, 1783-1787.
- 4) Gao H, Wang LD, et al. : p53 tumor suppressor gene mutation in early esophageal precancerous lesions and carcinoma among high-risk populations in Henan, China. *Cancer Res* (1994) **54**, 4342-4346.
- 5) Sozzi G, Miozzo M, et al. : Genetic evidence for an independent origin of multiple preneoplastic and neoplastic lung lesions. *Cancer Res* (1995) **55**, 135-140.
- 6) Izawa T, Obara T, et al. : Clonality and field cancerization in intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. *Cancer* (2001) **92**, 1807-1817.
- 7) Kanjilal S, Strom SS, et al. : p53 Mutations in nonmelanoma skin cancer of the head and neck : molecular evidence for field cancerization. *Cancer Res* (1995) **55**, 3604-3609.
- 8) Jones PA, Baylin SB : The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* (2002) **3**, 415-428.
- 9) Jones PA, Laird PW : Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* (1999) **21**, 163-167.
- 10) Nagasaka T, Sharp GB, et al. : Hypermethylation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase promoter may predict nonrecurrence after chemotherapy in colorectal cancer cases. *Clin Cancer Res* (2003) **9**, 5306-5312.
- 11) Xiong Z, Laird PW, et al. : COBRA : a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* (1997) **25**, 2532-2534.
- 12) Rashid A, Shen L, et al. : CpG island methylation in colorectal adenomas. *Am J Pathol* (2001) **159**, 1129-1135.
- 13) Shen L, Kondo Y, et al. : P14 methylation in human colon cancer is associated with microsatellite instability and wild-type p53. *Gastroenterology* (2003) **124**, 626-633.
- 14) Toyota M, Shen L, et al. : Aberrant methylation of the cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. *Cancer Res* (2000) **60**, 4044-4048.
- 15) Nagasaka T, Sasamoto H, et al. : Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation. *J Clin Oncol* (2004) **22**, 4584-4594.
- 16) Hainaut P, Hernandez T, et al. : IARC database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines : updated compilation, revised formats and new visualization tools. *Nucl Acid Res* (1998) **26**, 205-213.
- 17) Wolf P, Hu YC, et al. : O6-methylation-DNA methyltransferase promoter hypermethylation shifts the p53 mutational spectrum in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* (2001) **61**, 8113-8117.
- 18) Esteller M, Risques R-A, et al. : Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with the presence of G : C to A : T transition mutations in p53 in human colorectal tumorigenesis. *Cancer Res* (2001) **61**, 4689-4692.
- 19) Zhang L, Lu W, et al. : Inactivation of DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation and its relation to p53 mutations in esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* (2003) **24**, 1039-1044.